

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—10584

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 27/30  
27/40  
// C 12 Q 1/00

識別記号

庁内整理番号  
7363—2G  
7363—2G  
7349—4B

⑬ 公開 昭和55年(1980)1月25日

発明の数 2  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑭ 酵素電極およびその製造法

門真市大字門真1006番地松下電  
器産業株式会社内

⑮ 特 願 昭53—84482

⑯ 発 明 者 飯島孝志

⑰ 出 願 昭53(1978)7月10日

門真市大字門真1006番地松下電  
器産業株式会社内

⑱ 発 明 者 南海史朗

⑲ 出 願 人 松下電器産業株式会社

門真市大字門真1006番地松下電  
器産業株式会社内

門真市大字門真1006番地

⑳ 発 明 者 中村研一

㉑ 代 理 人 弁理士 中尾敏男 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

酵素電極およびその製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 電子伝導性物質からなる第1の層と、電子伝導性物質と固定化された酸化還元酵素および前記酵素と共役する不溶性レドックス化合物を含む第2の層とを有することを特徴とする酵素電極。

(2) 第2の層が、前記酵素の補酵素を固定化している特許請求の範囲第1項記載の酵素電極。

(3) 電子伝導性物質と不溶性レドックス化合物の混合物上に酸化還元酵素を固定化してなる層と、電子伝導性物質からなる層とを一体に成型することを特徴とする酵素電極の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、酵素の特異的触媒作用を受ける基質に対して電気化学的活性を有し、基質の濃度を迅速かつ簡便に測定することができ、しかも連続使用、繰り返し使用のできる酵素電極を得ることを目的とする。本発明は、また酵素電極などと組み

合わせることにより、基質のもつ化学エネルギーを電気エネルギーに変換する電池に用いられる酵素電極に関する。

酵素の有する特異的触媒作用を工業的に利用する試みの一例として、酵素反応系と電気化学反応系を結びつけることにより、酵素と特異的に反応する物質である基質の濃度を検出することが試みられている。酵素反応を電気化学反応として扱うには、例えば、酵素反応系にこれと共役する適当なレドックス化合物を介在させ、このレドックス化合物の酸化還元反応を電気化学的に検出する方法が用いられている。具体的には酵素との共役反応で還元(又は酸化)されたレドックス化合物を電気化学的に酸化(又は還元)し、基質濃度をこのとき流れる電流として検出することができる。しかし高価な酵素やレドックス化合物を溶解した状態で使用するため、これらを測定毎に使い捨てることになり、また測定操作も煩雑である。

これらの問題を解決し、酵素などの繰り返し使用を可能とし、実用的な酵素電極とするためには、

酵素、レドックス化合物を集電体としての電子伝導性物質とともに一体固定化する必要がある。

本発明者らは、これら酵素、レドックス化合物を一体固定化した酵素電極を得る方法について種々検討した結果、電子伝導性物質として例えばカーボン粉末と不溶性レドックス化合物の混合物をプレス成型し、この成型体上に酵素を固定化する方法、あるいは前記混合物中に予め酵素を固定化したカーボン粉末を混合しておき、その後成型体とする方法を見出した。こうして得られた酵素電極は、基質濃度を迅速かつ簡便に測定しうるものであった。

本発明は、この酵素電極を改良し、電子伝導性物質からなる第1の層と、電子伝導性物質と固定化された酵素とこれと共役する不溶性レドックス化合物とからなる第2の層とで構成することにより、酵素およびレドックス化合物の使用量を大幅に減少させ、かつ高性能な酵素電極を得ることに成功したものである。この構成によればきわめて簡便なる製造法で酵素電極を得ることができる。

第1図は本発明による酵素電極の構成例を示す。

図中1は電子伝導性物質からなる第1の層、2は固定化された酵素と、この酵素と共役する不溶性レドックス化合物と電子伝導性物質とからなる第2の層であり、両者は一体成型により構成される。層2は基質と酵素およびレドックス化合物の間の反応を行なわせる部分であり、層1は層2の集電体および基体の役割を果たす。これら2層の構成としては第2図に示すように、反応層を両側に設けるなど必要に応じて組み合わせることができる。このようにして、必要最小限量の酵素、不溶性レドックス化合物で電極を構成することができる。

次に酵素電極を用いた測定方法について述べる。

第3図に本発明による酵素電極を用いて基質濃度を測定する場合の測定系を示す。図中3は記録計、4はポテンショスタット、5は参照極、6は塩橋、7は対極、8は上記の酵素電極9を装着した電極ホルダー、10は基質を含むPH6.8のリン酸緩衝液である。

なお酵素電極9は、層2が緩衝液と接触するよ

うにホルダー8に装着され、層1には例えば白金のリードが付けられる。

酵素電極9を緩衝液に浸漬後、電極電位を参照極に対し一定電位に保持し、基質の濃度変化に伴うレドックス化合物の酸化還元電流の変化量を検出する。このとき、溶液中に基質が存在しない場合にも、電子伝導性物質や固定化に用いた試料酵素、あるいはレドックス化合物中の不純物などの酸化還元に伴う残余電流が流れる。この残余電流の大小は基質、酵素、レドックス化合物の反応に基づく応答電流のS/N比を決定する。

これに関して、電極性能を向上するには、レドックス化合物、酵素の量を必要最小限度とし、これらを電子伝導性物質とともに最適な構成とする必要がある。またこうすることにより高価な酵素、レドックス化合物の有効利用を図ることができる。電子伝導性物質としては、酸化還元に対して安定な金属あるいは酸化スズなどの導電性金属酸化物を用いることができる。特にカーボンは化学的に安定な良導電性物質であり、加えて酵素反応を阻

害することもないなど電子伝導性物質として好ましい。

次にこの酵素電極の製造法について説明する。まず、粉末状とした電子伝導性物質と不溶性レドックス化合物を十分混合する。この混合物上に酵素、必要ならば補酵素をも含めてグルタルアルデヒドなどの架橋試薬を用いて固定化する。次に、得られた電子伝導性物質、不溶性レドックス化合物、固定化酵素からなる混合物の少量と電子伝導性物質とを例えばプレス成型などにより一体成型する。この場合成型体の強度を上げるためには、結着剤を用いても良い。また、酵素の固定化については、上記方法以外に、電子伝導性物質と酵素を直接化学結合するなど、各種の方法を用いることができる。

以下本発明についてその実施例により説明する。

電子伝導性物質としてのアセチレンブラック、黒鉛などのカーボン粉末と、不溶性レドックス化合物としてのクロルアニルを十分に混合する。次にこの混合物上にグルタルアルデヒドを用いて、



酸化還元酵素であるグルコースオキシダーゼを固定化する。こうして得られたカーボン、クロルアニル、固定化グルコースオキシダーゼの混合物の少量とカーボン粉末をプレス成型により一体成型する。

上記の酵素電極を用いて、グルコース濃度を  $2 \times 10^{-4}$  モル/l としたときの電流値の変化を第4図に示す。またグルコース濃度と電流増加量の関係を第5図に示す。図より明らかなごとく、この酵素電極は、基質の添加に対して迅速に応答し、かつ残余電流も少なく、基質濃度変化に対する応答直線性も良好であるなど、優れた特性を有する。

酵素が、アルコール脱水素酵素などのように、補酵素を必要とする場合には、酵素とともに補酵素をも、電子伝導性物質と不溶性レドックス化合物の混合物上に固定化しておくと、前記同様に良好な応答特性が得られた。

レドックス化合物としては、クロルアニルの他にブロムアニルあるいは各種レドックスポリマーなどの不溶性レドックス化合物を用いても良い。

以上述べた如く、本発明によれば、酵素、レドックス化合物の有効利用を図り、きわめて容易に優れた性能を有する酵素電極を得ることができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の酵素電極の構成例を示す図、第2図は他の構成例を示す図、第3図は基質濃度の測定系を示す図、第4図は酵素電極のグルコースに対する応答特性を示す図、第5図はグルコース濃度と電流増加量との関係を示す。

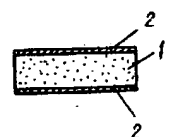
1 ..... 第1の層、2 ..... 第2の層。

代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

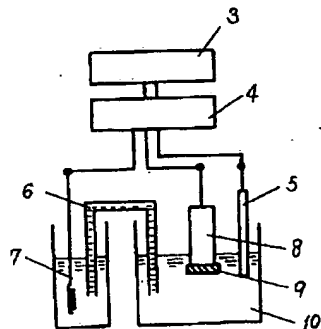
第 1 図



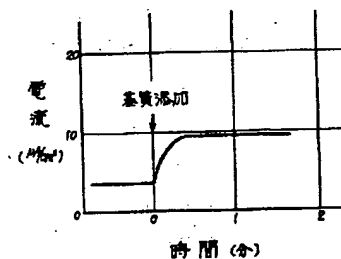
第 2 図



第 3 図



第 4 図



第 5 図

